

Rec'd PCT/PTO 12 OCT 2004

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/04633

11.04.03

10/511230

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年10月16日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-301286

[ST.10/C]:

[JP2002-301286]

出 願 人

Applicant(s):

株式会社ヤクルト本社

REC'D 06 JUN 2003

WIPO

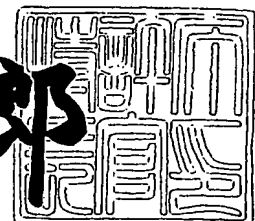
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月20日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3037241

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 PJ24042

【提出日】 平成14年10月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07C 57/12

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト
本社内

 【氏名】 水澤 直美

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト
本社内

 【氏名】 酒井 正士

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト
本社内

 【氏名】 白澤 幸生

【特許出願人】

 【識別番号】 000006884

 【氏名又は名称】 株式会社ヤクルト本社

【代理人】

 【識別番号】 100092082

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 佐藤 正年

【代理人】

 【識別番号】 100099586

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 佐藤 年哉

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007629

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9106022

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 共役脂肪酸の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を、共役化処理能を有するビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*) 属細菌又は該細菌より得た酵素を用いて、共役化する工程を含むことを特徴とする共役脂肪酸の製造方法。

【請求項 2】 前記二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸として、リノール酸を用いることを特徴とする請求項 1 記載の共役脂肪酸の製造方法。

【請求項 3】 前記共役化する工程が、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を含有する培地に、ビフィドバクテリウム属細菌を接種し、培養する工程を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の共役脂肪酸の製造方法。

【請求項 4】 ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*)又はビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) から選ばれる 1 種以上であることを特徴とする請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項に記載の共役脂肪酸の製造方法。

【請求項 5】 ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*) FERM P-18459 , ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*) FERM BP-791, ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*) ATCC15702 及びビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) ATCC27919 から選ばれる 1 種以上であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載の共役脂肪酸の製造方法。

【請求項 6】 前記培地として乳培地を用いて、共役脂肪酸含有発酵乳を得ることを特徴とする請求項 3 ～ 5 の何れか 1 項に記載の共役脂肪酸の製造法。

【請求項 7】 前記培地として脂質結合タンパク質及び界面活性剤を含まない乳培地を用いて、共役脂肪酸含有発酵乳を得ることを特徴とする請求項 3～6 の何れか 1 項に記載の共役脂肪酸の製造方法。

【請求項 8】 前記ビフィドバクテリウム属細菌として、
リノール酸を共役リノール酸に変換する能力を有し、
次の(a) 及び(b) 工程によって、培地中に少なくとも 0.5 mg/5 ml の共役リノール酸を産生する能力を有する細菌を用いることを特徴とする請求項 1～7 の何れか 1 項に記載の共役脂肪酸の製造方法。

(a) リノール酸-B S A-複合体を含む M R S 培地にて少なくとも 24 時間前培養する工程、

(b) リノール酸-B S A-複合体を含む乳培地に、工程(a) で得られたビフィドバクテリウム属細菌を 3.8 %接種し、144 時間振盪培養する工程、

【請求項 9】 リノール酸を共役リノール酸に変換する能力を有するビフィドバクテリウム属細菌であって、

次の(a) 及び(b) 工程によって、培地中に少なくとも 0.5 mg/5 ml の共役リノール酸を産生する能力を有することを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌。

(a) リノール酸-B S A-複合体を含む M R S 培地にて少なくとも 24 時間前培養する工程、

(b) リノール酸-B S A-複合体を含む乳培地に、工程(a) で得られたビフィドバクテリウム属細菌を 3.8 %接種し、144 時間振盪培養する工程、

【請求項 10】 請求項 1～8 の何れかに記載の方法により得られた共役脂肪酸を含有する飲食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌を利用して特定の共役脂肪酸を効率よく製造する方法及びこの方法により得られた共役脂肪酸を含有する飲食品に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

共役脂肪酸は隣り合う炭素が単結合を挟んで二重結合を持つ脂肪酸であるが、とりわけ炭素数18の脂肪酸分子内に共役ジエンを1個持つ共役リノール酸は、様々な生理活性を持つことが明らかにされている。

【0003】

共役リノール酸を工業的に製造する方法としては、例えばリノール酸を含む油脂、あるいは遊離型のリノール酸をエチレングリコールなどの有機溶媒下で行うアルカリ共役化法が知られている。

【0004】

アルカリ共役化法は、通常、不飽和脂肪酸と過剰のアルカリを有機溶媒中で150℃以上に加熱して行われる。この時、得られる共役脂肪酸は、二重結合の結合位置や配置が異なる混合物であり、例えば原料にリノール酸を用いた場合は、得られるのはcis-9,trans-11型あるいはtrans-9, cis-11型、trans-10, cis-12型の共役リノール酸であり、その他いくつかの位置あるいは幾何異性体を含んでいる。

【0005】

従って、上記共役脂肪酸の生理作用は、共役脂肪酸の混合物としての作用であり、特定の共役脂肪酸が製造できれば学術的にも産業的にも応用価値は高い。また、アルカリ共役化法では、環化およびその他の副反応も起こり、共役脂肪酸の収率が低下すること、精製が困難になることなどの問題点も指摘されている。

【0006】

一方、微生物あるいはその酵素が共役脂肪酸を作ることが報告されている。例えば、ルーメン細菌が多価不飽和脂肪酸から共役脂肪酸を産生すること（例えば、非特許文献1を参照）をはじめとして、トレポネーマ(Treponema)（例えば、非特許文献2を参照）、*Butyrivibrio fibrisolvens*（例えば、非特許文献3を参照）、*Propionibacterium freudenreichii*（例えば、非特許文献4を参照）、種々の肺の病原菌の一割強（例えば、非特許文献5を参照）などがリノール酸異性化活性を持ち、また、これらの微生物によって産生される共役リノール酸は cis

-9、trans-11型異性体が主体であることも報告されている。

【0007】

一方、反芻動物は自らの体内で cis-9,trans-11型共役リノール酸を産生していることから、乳製品や畜肉には cis-9,trans-11型共役リノール酸が多く含有されており、cis-9,trans-11型共役リノール酸は通常の食生活でヒトが摂取する機会の多い共役リノール酸であると考えられる。それゆえ、本異性体の生理効果については多くの研究が行われ、種々の癌に対する防御作用があることが明らかとなってきた(例えば、非特許文献6及び7を参照)。

【0008】

以上のように、微生物を用いれば、抗癌作用の期待される cis-9,trans-11型共役リノール酸含量の高い生成物が得られることが期待できる。しかしながら、副産物が少なく、十分な量の共役リノール酸を産生する微生物は未だ見出されていない。

【0009】

一方、腸内細菌の一種であるビフィドバクテリウム属細菌も食品への利用価値の高い微生物として知られている。ビフィドバクテリウム属細菌は、ヒト大腸へ定着し、便性改善、腸内腐敗抑制など、様々な有益な作用を示すことから近年では発酵乳などにも利用されるようになってきている。

【0010】

しかしながら、ビフィドバクテリウム属細菌は偏性嫌気性であり酸素の存在下や低pH下では死滅しやすいため、ビフィドバクテリウム属細菌を用いた研究を行うには、適切な作業環境や熟練した操作が必要とされる。このような理由もあって、共役リノール酸製造も含めビフィドバクテリウム属細菌を用いた物質生産に関する研究はほとんど行われていなかった。

【0011】

【非特許文献1】

Shorland F.B., et al., Nature 175, p1129, 1955

【非特許文献2】

Yokoyama, et al., J. Bacteriology 107, P519-527, 1971

【非特許文献3】

Kepler C.R., et al., J. Biol. Chem. 242, p5686-92, 1967

【非特許文献4】

Jiang J., Doctoral thesis, Swedish Uni. Uppsala, 1998

【非特許文献5】

Jack C.I.A., et al., Clinica chimica Acta 224, p139-4, 1994

【非特許文献6】

a Y.L., et al., Cancer Research 50, P1097-1101, 1990

【非特許文献7】

Ip C., et al., Cancer Research 51, P6118-6124

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

前述のように、アルカリ共役化法は、高温における反応のため副反応が起こりやすく特定の共役脂肪酸を得ることが困難であり、その後の精製が煩雑であるなどの問題点があった。また、微生物による変換反応では、共役リノール酸には a 11 trans型共役リノール酸も同時に副産されてしまい、また、共役リノール酸全体の産生量も必ずしも満足し得るものではなかった。

【0013】

本発明は、こうした問題点を解決すべく、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化することを目的とし、特に、リノール酸から生理効果の高い cis-9, trans-11型共役リノール酸のみを選択的かつ高効率に得る方法を得ることを目的とする。更に、リノール酸から生理効果の高い cis-9, trans-11型共役リノール酸を効率良く産生する能力を有する細菌、及び、共役脂肪酸を含んだ飲食品を得ることを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】

請求項1に記載された発明に係る共役脂肪酸の製造方法は、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を、共役化処理能を有するビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属細菌又は該細菌より得た酵素を用いて、共役化する工程

を含むことを特徴とするものである。

【0015】

請求項2に記載された発明に係る共役脂肪酸の製造方法は、請求項1に記載の二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸として、リノール酸を用いることを特徴とするものである。

【0016】

請求項3に記載された発明に係る共役脂肪酸の製造方法は、請求項1又は2に記載の共役化する工程が、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を含有する培地に、ビフィドバクテリウム属細菌を接種し、培養する工程を含むことを特徴とするものである。

【0017】

請求項4に記載された発明に係る共役脂肪酸の製造方法は、請求項1～3の何れか1項に記載のビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*)又はビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)から選ばれる1種以上であることを特徴とするものである。

【0018】

請求項5に記載された発明に係る共役脂肪酸の製造方法は、請求項1～4の何れか1項に記載のビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)FERM P-18459、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)FERM BP-791、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*)ATCC15702 及びビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)ATCC27919から選ばれる1種以上であることを特徴とするものである。

【0019】

請求項6に記載された発明に係る共役脂肪酸の製造方法は、請求項3～5の何れか1項に記載の培地として、乳培地を用いることを特徴とするものである。

【 0 0 2 0 】

請求項 7 に記載された発明に係る共役脂肪酸の製造方法は、請求項 3 ～ 5 の何れか 1 項に記載の培地として、脂質結合タンパク質及び界面活性剤を含まない乳培地を用いることを特徴とするものである。

【 0 0 2 1 】

請求項 8 に記載された発明に係る共役脂肪酸の製造方法は、請求項 1 ～ 7 の何れか 1 項に記載のビフィドバクテリウム属細菌として、

リノール酸を共役リノール酸に変換する能力を有し、

次の (a) 及び (b) 工程によって、培地中に少なくとも 0.5 mg / 5 ml の共役リノール酸を産生する能力を有する細菌を用いることを特徴とするものである。

(a) リノール酸 - B S A - 複合体を含む M R S 培地にて少なくとも 2 4 時間前培養する工程、

(b) リノール酸 - B S A - 複合体を含む乳培地に、工程 (a) で得られたビフィドバクテリウム属細菌を 3.8 % 接種し、1 4 4 時間振盪培養する工程、

【 0 0 2 2 】

請求項 9 に記載された発明に係るビフィドバクテリウム属細菌は、リノール酸を共役リノール酸に変換する能力を有するビフィドバクテリウム属細菌であって、

次の (a) 及び (b) 工程によって、培地中に少なくとも 0.5 mg / 5 ml の共役リノール酸を産生する能力を有するものである。

(a) リノール酸 - B S A - 複合体を含む M R S 培地にて少なくとも 2 4 時間前培養する工程、

(b) リノール酸 - B S A - 複合体を含む乳培地に、工程 (a) で得られたビフィドバクテリウム属細菌を 3.8 % 接種し、1 4 4 時間振盪培養する工程、

【 0 0 2 3 】

請求項 1 0 に記載された発明に係る共役脂肪酸を含有する飲食品は、請求項 1 ～ 8 の何れかに記載の方法により得られたものである。

【 0 0 2 4 】

【発明の実施の形態】

本発明者らはビフィドバクテリウム属細菌を用いた共役リノール酸の製造方法を見出すべく鋭意研究を進めた結果、ある種のビフィドバクテリウム属細菌に共役化処理能、即ち、不飽和脂肪酸分子内の二重結合の位置を移動させ二重結合同士が互いに共役する状態に異性化する能力、があることを見出した。即ち、本発明に係る共役脂肪酸の製造法は、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を、共役化処理能を有するビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*) 属細菌又は該細菌より得た酵素を用いて、共役化することにより、上述の課題を解決するものである。

【0025】

本発明による方法においては、ビフィドバクテリウム属細菌を用いて二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化するものであるため、生理活性が高いとされている $cis-9,trans-11$ 型共役リノール酸に代表される共役脂肪酸を選択的かつ高収率で製造することができる。

【0026】

本発明において、原料として用いられる、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸は特に限定されず、例えばリノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などいずれも好適に使用し得る。特に、リノール酸を原料として共役リノール酸を生成させた場合、生理活性の報告されている特定の異性体の特異的かつ効率よく生成し、他の異性体（副産物）の量は極微量となるため好ましい。

【0027】

また、上記不飽和脂肪酸は、塩またはエステルなどを形成していても良く、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等が挙げられ、エステルとしてはメチルエステル、エチルエステルのほか上記脂肪酸を含むその他の脂質類（リン脂質、糖脂質等）、モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライドなどを用いることも可能である。

【0028】

また、天然油脂も原料として用いることができ、例えばリノール酸を分子内に多く含むものとしてはサフラワー油、綿実油、大豆油、ヒマワリ種子油、トウモロコシ油、落花生油、米ぬか油、アマニ油、カカオ脂などの植物由来の天然油脂などが、リノレン酸を分子内に多く含むものとしてはイワシ油、ニシン油、タラ油などの動物由来の天然油脂などが挙げられ、さらにこれらのリパーゼ分解物なども原料として用いることが可能である。

【 0 0 2 9 】

本発明においては、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を含有する培地に、ビフィドバクテリウム属細菌を接種し、培養することが好ましい。このための培地として、乳培地を用いることが好適である。

【 0 0 3 0 】

また、ビフィドバクテリウム属細菌としては、不飽和脂肪酸分子内の二重結合の位置を移動させ二重結合同士が互いに共役する状態に異性化する能力を有する細菌であればよく、特にリノール酸共役化処理能、即ち、リノール酸から生理効果の高いcis-9,trans-11型共役リノール酸を効率良く産生する能力を有するものが好ましい。共役化処理能を有するものとしては、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*)又はビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) から選ばれる1種以上を用いることが、収率が高いため好ましく、特にビフィドバクテリウム・ブレーベが好ましい。

【 0 0 3 1 】

特に、ビフィドバクテリウム・ブレーベ FERM P-18459 株は、リノール酸-B S A-複合体を含むM R S培地にて少なくとも24時間、前培養された後、この培養されたビフィドバクテリウム属細菌をリノール酸-B S A-複合体を含む乳培地に3.8wt%接種し、144時間振盪培養することにより、培地中に少なくとも0.5mg/5mlの共役リノール酸を産生する能力を有する、共役リノール酸産生能の極めて高い株であるため好ましい。このように優れた産生能を有する株は、これを用いてリノール酸を含む食品素材（例えば、乳原料）を発酵した

場合に、発酵後の発酵食品（例えば、発酵乳）中に、生理効果を期待できる程度の共役リノール酸を産生させることができるので、食品製造の作業性等において特に適したものである。

【0032】

本発明による共役脂肪酸の製造方法で用いられるビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) は乳児・哺乳牛の糞便、膣から分離された菌株である。菌株としては、例えばビフィドバクテリウム・ブレーベ ATCC15698、ATCC15701、YIT 4064、YIT 4065、FERM P-18459などが挙げられるが、特に、ビフィドバクテリウム・ブレーベ FERM P-18459はcis-9, trans-11型共役リノール酸を効率良く製造することができる優れた株である。尚、ビフィドバクテリウム・ブレーベ FERM P-18459 は、平成13年8月14日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託済である。

【0033】

ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*) は、乳児の糞便から分離された菌株である。菌株としては、例えばビフィドバクテリウム・インファンティス ATCC15702 が挙げられる。

【0034】

ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) は、成人・乳児・哺乳牛の糞便、膣から分離された菌株であり、菌株としては、例えばビフィドバクテリウム・ビフィダム FERM BP-791などが挙げられる。

【0035】

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) は、下水、乳児の糞便、哺乳仔ウシの糞便より分離された菌株であり、菌株としては、例えばビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム ATCC27919などが挙げられる。

【0036】

本発明において共役脂肪酸を製造するためにビフィドバクテリウム属細菌、特にビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティス又はビフィドバクテリウム・シュードカテ

ヌラータムから選ばれる 1 種又は 2 種以上のビフィドバクテリウム属細菌を用いて不飽和脂肪酸を共役化する処理としては、原料の不飽和脂肪酸を含有する増殖培地中でビフィドバクテリウム属細菌を培養して直接共役脂肪酸を生成させる方法、あるいは何らかの方法でビフィドバクテリウム属細菌を培養して集菌し洗浄した菌体（洗浄菌体）を原料の不飽和脂肪酸を含有する溶液に加えて反応させることにより共役脂肪酸を生成させる方法など何れの方法を用いることも可能である。更に、不飽和脂肪酸を含有する溶液中では、ビフィドバクテリウム属細菌の生菌体のみならず、死菌体、菌体抽出液、菌体から抽出した酵素などを利用して反応を行うことも可能である。

【 0 0 3 7 】

ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティス又はビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム等のビフィドバクテリウム属細菌を培養するための培地としては、ビフィドバクテリウム属細菌の増殖用に通常用いられる培地や乳を含む乳培地を用いることができ、特に乳を用いた培地中で不飽和脂肪酸を処理することが好ましい。

【 0 0 3 8 】

通常用いられている増殖培地、例えば M R S 培地等を用いると、リノール酸等の原料油類が培地に分散せず処理効率も悪くなるため、B S A（牛血清アルブミン）等の脂質結合タンパク質や界面活性剤の添加や、厳しい条件での均質化処理が必要となるが、乳培地を用いた場合には、原料油類の均質化が比較的容易となり、作業性、処理効率が向上し、B S A 等の添加によるコスト上昇を抑制できるためである。また、B S A 等の脂質結合タンパク質や界面活性剤は、風味への影響を与えてしまうため、特に共役脂肪酸を含む食品製造において本発明を用いる場合には、B S A を含まなくても効率よく反応を行なえる乳培地を用い、発酵乳を製造することが好ましい。

【 0 0 3 9 】

乳培地において、このような優れた分散性が得られる理由としては、乳中に含まれる蛋白成分などの影響が考えられるが定かではない。なお、本明細書中にお

いて乳とは、牛乳・山羊乳などの獣乳の生乳、脱脂粉乳、全脂粉乳、生クリーム、あるいは豆乳・アーモンド乳・ココナッツミルク等の植物乳の各種乳蛋白含有物を指す。

【0040】

また、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティス又はビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータム等のビフィドバクテリウム属細菌の洗浄菌体あるいは菌体末、死菌体、菌体抽出液などを利用して反応を行う場合、洗浄菌体や菌体末、死菌体、菌体抽出液の調製は定法に従えば良い。例えば、洗浄菌体は、生理食塩水や緩衝液などで培養菌体を洗浄して得ることができ、菌体末は凍結乾燥や噴霧乾燥などの乾燥技術により得ることができる。

【0041】

死菌体を得る方法としては、細胞壁溶解酵素を作用させる方法の他に、低浸透圧で処理する方法、凍結融解する方法、高圧処理する方法、破碎処理する方法、加熱処理する方法などが挙げられる。中でも、菌体を加熱処理し自己融解させる方法は、コストをかけずに大量の菌体を処理できる点で好ましい。菌体抽出液は、上記のようにして得た洗浄菌体、菌体末、死菌体などに適切な溶媒を添加した後、遠心分離上清として得ることができる。

【0042】

ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティス又はビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータム等のビフィドバクテリウム属細菌を用いて共役脂肪酸を製造するための共役化処理法としてより具体的には、例えば以下の(a)～(e)を挙げることができる。

【0043】

- (a) ビフィドバクテリウム属細菌を増殖培地や乳培地（発酵乳）中で培養して発酵生産の形で不飽和脂肪酸を共役化する方法
- (b) 不飽和脂肪酸をビフィドバクテリウム属細菌の洗浄菌体で共役化する方法
- (c) ビフィドバクテリウム属細菌菌末を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法

- (d) ビフィドバクテリウム属細菌死菌体を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法
- (e) ビフィドバクテリウム属細菌菌体抽出液を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法

【 0 0 4 4 】

以下、処理法(a)～(e)について詳述する。

- (a) ビフィドバクテリウム属細菌を増殖培地や発酵乳中で培養して発酵生産の形で不飽和脂肪酸を共役化する方法：

増殖培地あるいは発酵乳中で共役化を行う際は、基本操作は一般的に行われている手法で行えば良いが、スターターとしては以下のものを用いるのが好ましい。

【 0 0 4 5 】

まず菌体調製において変換能を効率的に誘導するため、文献（京都大学大学院農学研究科・大村依子ら、平成11年度日本生物工学会要旨集、p 1 9 1）を参考にしてリノール酸などの不飽和脂肪酸をMRS (LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO社製)培地などの乳酸菌用増殖培地に添加した。この濃度は0～0.2%で、特に0.05～0.1%が好ましい。

【 0 0 4 6 】

この際の培養は、pH3.5～5.5で停止することが好ましく、特に、4.5～5.5で停止することが好ましい。pH3.5以下まで培養すると菌の過増殖により共役化能が低下してしまう場合もあり、pH5.5以上では共役化を行うのに十分な菌体量が得られないためである。

【 0 0 4 7 】

以上のようにして培養した培養液をスターターとして用いるのが好ましく、スターター接種量は発酵乳調整用培地の0.5～8%が好ましく、特に1～4%程度が好ましい。原料は培地中に0.02～0.8%程度が好ましく、特に0.1～0.2%が好ましい。培養温度は20～40℃程度、好ましくは28～37℃である。

【 0 0 4 8 】

より効率良く目的とする共役脂肪酸を得るためには培養はpH3.5～5.5で停止することが好ましく、特にpH4.5～5.5で停止することが好ましい。また、中和

培養でも同様に目的とする共役脂肪酸を得ることが出来る。

【 0 0 4 9 】

(b) 不飽和脂肪酸をビフィドバクテリウム属細菌の洗浄菌体で共役化する方法：

処理法(a) のスターター調製時と同様の培養条件によって培養した菌体を生理食塩水にて洗浄したものを回収し、緩衝液に懸濁させた。この菌体を懸濁させる緩衝液および洗浄菌体反応は適度な pH を維持できる条件の水溶液を用いて行う。例えば 0.1~1.0M のリン酸緩衝液が好ましく、pH は 5.0~7.5 であるが、好ましくは 6.0~7.0 である。菌体懸濁液の菌体濃度は、湿重で 0.025~0.25% であり、好ましくは 0.025~0.1% である。原料は、添加時の原料を牛血清アルブミン (BSA) との混合液としており原料濃度は反応溶液中に 0.1~4.0% 程度添加することが好ましく、特に 0.3~1.0% が好ましい。

【 0 0 5 0 】

また、BSA の混合比率は原料に対して 5 分の 1 程度が好ましい。洗浄菌体による変換反応の際の温度は 20~52℃ だが、好ましくは 32~37℃ である。変換生成の適正な時間は 1~96 時間であり、好ましくは 24~72 時間である。なお、pH を中和しながら培養した菌体も同様に用いることが出来る。

【 0 0 5 1 】

(c) ビフィドバクテリウム属細菌菌末を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法：

ビフィドバクテリウム属細菌菌末は、例えば処理法(a) のスターター調製時の培養条件と同様の方法にて得たビフィドバクテリウム属細菌菌体を乾燥処理により粉末化することにより得ることが出来る。乾燥処理方法としては凍結乾燥、噴霧乾燥などを利用することができる。なお、菌末調製後の変換反応は、処理法(b) の洗浄菌体反応の反応条件と同様に行えば良い。

【 0 0 5 2 】

(d) ビフィドバクテリウム属細菌死菌体を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法：

ビフィドバクテリウム属細菌菌体は、例えば処理法(a) のスターター調製時の培養条件と同様の方法にて得たビフィドバクテリウム属細菌菌体の細胞壁を破壊することにより得ることが出来る。細胞壁破壊は、細胞壁破壊酵素で処理する方

法や、菌体を溶媒に懸濁させて低浸透圧で処理する方法、凍結融解する方法、高圧処理する方法、破碎処理する方法、加熱処理する方法などを利用することができる。細胞壁破壊液調整後の変換反応は、処理法(b)の洗浄菌体反応の反応条件と同様に行えばよい。

【0053】

(e) ビフィドバクテリウム属細菌菌体抽出液を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法：

ビフィドバクテリウム属細菌菌体抽出液としては、例えば処理法(b)～(d)と同様の方法にて得たビフィドバクテリウム属細菌洗浄菌体、菌体末、死菌体などを適切な溶媒で抽出し、遠心分離などの方法により残渣を除去して得ることが出来る。なお、菌体抽出液調製後の反応は、処理法(b)の洗浄菌体反応の反応条件と同様に行えばよい。

【0054】

【表1】

GC分析条件

GC system	; ジーエルサイエンス社製GC-353B
Colum	; DB-23 (ID 0.25mm x 30m)
Oven	; 160℃→220℃ (at 2℃/min)
Inj Temp	; 250℃
Det Temp	; 250℃
Carrier Gas	; N ₂ (50mL/min)
Detector	; FID
Sample Size	; 1 μL in hexane
Sprit	; 1/100

【0055】

上記(a)～(d)等、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティス又はビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムから選ばれる1種又は2種以上のビフィドバクテリウム属細菌により得られる反応液または培養液の脂肪酸組成は、ガスクロマトグラフィー分析により内部標準物質と各脂肪酸の面積値の比率をもとに各脂肪酸量を算出できる。なお、例えば、共役リノール酸を対象とする場合には、ガスク

ロマトグラフィーは表1に示す条件で行えばよい。

【0056】

本発明により得られる共役脂肪酸は、医薬品、食品、化粧品等の形態で投与することができる。例えば共役リノールの生理効果を訴求する医薬品や栄養補助食品等の形態で用いる場合であれば、カプセル剤、顆粒剤、錠剤、散剤等の固形製剤、或いはシロップ剤等の液状製剤として経口投与することができる。また、経口投与剤でなくとも、注射剤、皮膚外用剤、直腸投与剤等非経口形態で投与することも可能である。

【0057】

各製剤の製造時には、乳糖、澱粉、結晶セルロース、乳酸カルシウム、メタゲイ酸アルミン酸マグネシウム、無水ケイ酸等の賦形剤、白糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク、モノグリセリド、蔗糖脂肪酸エステル等の滑沢剤や、その他、医薬・食品等として許容され待る成分を適宜使用すればよい。

【0058】

また、同様の生理効果を期待して一般食品形態（「明らか食品」の形態）で用いる場合には、本発明の方法により得られた共役脂肪酸をそのまま或いは適宜精製処理したものを油脂、錠菓、発酵乳、飴、調味料、ふりかけ等の飲食品に添加し、常法を用いて製造すればよい。発酵食品として用いる場合には、発酵原料中の二重結合を二つ以上有する脂肪酸を添加し、発酵菌により発酵（培養）させ、製造することができる。特にリノール酸を含む乳を発酵した発酵乳とすれば、前記のとおりcis-9,trans-11型共役リノール酸を特異的かつ多量に含有させることが容易であるため好ましい。

【0059】

本発明は更に、上述の本発明による方法によって得られた共役脂肪酸を含有する飲食品も提供する。

【0060】

なお、発酵乳とは、乳等省令により定められている発酵乳、乳製品乳酸菌飲料

等の生菌含有タイプの飲料や殺菌処理の施された発酵乳を含有する乳性飲料、更には、ケフィア等のことである。発酵に際しては、その他の菌、例えばラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ガッセリ、ラクトバチルス・ゼアエ、ラクトバチルス・ジョンソニー、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、ブルガリカス、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、デルブルッキ等のラクトバチルス属細菌やストレプトコッカス・サーモフィルス等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、ラクチス、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、クレモリス、ラクトコッカス・プランタラム、ラクトコッカス・ラフィノラクチス等のラクトコッカス属細菌、ロイコノストック・メセンテロイデス、ロイコノストック・ラクチス等のロイコノストック属細菌、エンテロコッカス・フェカーリス、エンテロコッカス・フェシウム等のエンテロコッカス属細菌等を使用できる。

【0061】

また、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・アニマーリス等のビフィドバクテリウム属細菌や酵母その他の微生物を使用しても良い。これらは、1種または2種以上を組み合わせ使用することができる。

【0062】

また、これらの食品には、その他の食品素材、すなわち、各種糖質や乳化剤、増粘剤、甘味料、酸味料、果汁等を適宜配合してもよい。具体的には、蔗糖、異性化糖、グルコース、フラクトース、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロース等の糖類、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、パラチニット、還元水飴、還元麦芽糖水飴等の糖アルコール、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、レシチン等の乳化剤、カラギーナン、グァーガム、キサントガム、ペクチン、ローカストビーンガム等の増粘（安定）剤、が挙げられる。この他にも、ビタミンA、ビタミンB類等の各種ビタミン類やカルシウム、鉄、マンガン、亜鉛等のミネラル類を配合してもよい。

【0063】

これら医薬品、食品等の形態での使用に際しては、本発明の方法により得られた共役脂肪酸を適宜配合することができる。また、共役脂肪酸の生理効果を訴求する場合であれば、その効果を得られかつ過剰摂取等の問題が生じない程度の量、10mg～1000mg/日程度の摂取が見込まれる量を適宜配合しておけば良い。

【0064】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例になんら制約されるものではない。

【0065】

実施例1：共役リノール酸を産生するビフィドバクテリウム属細菌のスクリーニング

100mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) 1mL中にリノール酸50mgとBSA10mgを溶解し、あらかじめリノール酸-BSA複合体溶液を調製した。このリノール酸-BSA複合体溶液200 μ LをMRS(LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO社製)培地15mLに添加後、bifidobacterium属15菌株をそれぞれ接種し35℃、120rpm、48時間振盪培養し、ビフィドバクテリウム属細菌培養液を調製した。

【0066】

15mL容試験管(キャップ付き)に5mL分注した10%スキムミルク(グルコース1%、大豆ペプチド0.1%添加)培地に、リノール酸-BSA複合体溶液を100 μ L(リノール酸含量5mg)および先に調製したビフィドバクテリウム属細菌培養液を200 μ L添加し、キャップを閉めた。この培地を35℃、120rpmで144時間振盪培養し発酵乳を調製した。得られた発酵乳に内部標準物質(HEPTADECANOIC ACID)を1mg添加後Bligh-Dyer法にて抽出し、メチルエステル化(4%塩酸メタノール溶液で30分間室温静置)後、ガスクロマトグラフィーの分析に供し脂肪酸分析を行った。結果を次の表2に示す。

【0067】

【表 2】

144時間培養発酵乳(誘導:リノール酸)

単位(mg/5mL)

菌株名	YIT No.	外部登録 機関 No.	培養 後 pH	リノール 酸	共役リノール酸			ヒドロキシ酸		
					c9- t11	t10- c12	all トランス	HOA1	HOA2	oth- ers
<i>B. adolescentis</i>	4011	ATCC15703	3.6	1.08	0.00	0.00	0.00	0.08	1.32	0.56
<i>B. adolescentis</i>	4087	JCM7042	3.6	1.04	0.00	0.01	0.00	0.10	1.57	0.33
<i>B. bifidum</i>	4007	FERMBP-791	3.5	3.84	0.02	0.00	0.00	0.07	0.18	0.69
<i>B. bifidum</i>	4013		5.2	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85
<i>B. breve</i>	4064		3.6	3.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.76
<i>B. breve</i>	4065		3.6	1.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46
<i>B. breve</i>	10001	FERM P-18459	3.5	0.61	0.57	0.00	0.02	0.00	0.00	0.31
<i>B. catenulatum</i>	4016	ATCC27539	3.3	2.99	0.00	0.00	0.00	0.06	0.49	0.66
<i>B. catenulatum</i>	4118	JCM7130	4.4	3.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.73
<i>B. infantis</i>	4018	ATCC15697	6.0	4.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89
<i>B. infantis</i>	4019	ATCC15702	4.7	0.87	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52
<i>B. lactis</i>	4121	DSM10140	4.3	3.81	0.00	0.00	0.00	0.05	0.07	0.61
<i>B. longum</i>	4021	ATCC15707	3.8	2.81	0.00	0.00	0.00	0.06	0.56	0.70
<i>B. longum</i>	4037	ATCC15708	3.6	0.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27
<i>B. pseudocatenulatum</i>	4072	ATCC27919	3.7	4.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99

【0068】

共役リノール酸のピークは標準品(リノール油脂製 CLA80)のリテンションタイムを基準に判断し、解析を行った。その結果、*Bifidobacterium breve* FERM P-18459、*Bifidobacterium infantis* ATCC15702、*Bifidobacterium bifidum* FERM BP-791、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 で共役リノール酸の産生が認められた。

【0069】

特に、*Bifidobacterium breve* FERM P-18459 は添加したリノール酸(5mg)のうち11.4%が共役リノール酸に変換されており、これら産生された共役リノール酸のほとんどがcis-9,trans-11型共役リノール酸であった。しかしながら、同じ*Bifidobacterium breve*でも*Bifidobacterium breve* YIT 4064や*Bifidobacterium breve* YIT 4065 には共役リノール酸産生活性は認められず、共役リノール

酸産生活性は*Bifidobacterium breve* の中でも特別な菌株に限定されることが確認された。

【 0 0 7 0 】

実施例 2 : 洗浄菌体反応における共役リノール酸の産生

1 0 0 m M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1 m L 中にリノール酸 5 0 m g と B S A 1 0 m g を溶解し、あらかじめリノール酸-B S A -複合体溶液を調製した。

【 0 0 7 1 】

このリノール酸-B S A -複合体溶液を 1 5 m L の M R S 培地 (LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO 社製) に 0.07% の割合で添加した後 *Bifidobacterium breve* FERM P-18459 をそれぞれ接種し、3 5 °C、120rpm、4 8 時間振盪培養した。この培養液を遠心分離して菌体を回収し生理食塩水で 2 回洗浄して洗浄菌体を得た。

【 0 0 7 2 】

この洗浄菌体にリノール酸-B S A -複合体溶液を 1 0 0 μ L、1 0 0 m M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を 0.9 m L 添加し、窒素ガスにて気相を置換後密栓をし試験管内を嫌気状態に保ち 3 7 °C、120rpm で 7 2 時間反応した。

【 0 0 7 3 】

得られた反応液に内部標準物質 (HEPTADECANOIC ACID) を 1 m g 添加後 Bligh-Dyer 法にて抽出し、メチルエステル化 (4 % 塩酸メタノール溶液で 3 0 分間室温静置) 後、ガスクロマトグラフィーの分析に供し脂肪酸分析を行った。

【 0 0 7 4 】

その結果、*Bifidobacterium breve* FERM P-18459 では、添加した基質中のリノール酸の 0.9% が cis-9,trans-11 型共役リノール酸に変換されていた。

【 0 0 7 5 】

実施例 3 : *Bifidobacterium breve* FERM P-18459 を用いた共役リノール酸含有発酵食品の調製

脱脂粉乳を 1 0 %、グルコースを 1 %、大豆ペプチドを 0.1% 含む培地に、基質としてリノール酸を 0.1% または 1.0% 添加して 1 5 0 k g / c m ² の均質化処理を行った後、オートクレーブで 1 1 5 °C、1 0 分間の滅菌処理を行い発酵食品調製用培地を作製した。

【 0 0 7 6 】

MRS(LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO社製)培地 1 5 m L に *Bifidobacterium breve* FERM P-18459 を接種し 3 5 °C、120rpm、4 8 時間振盪培養し、ビフィドバクテリウム属細菌培養液を調製した。この培養液 6 m L を先に作製した発酵食品調製用培地 1 5 0 m L に接種し、気相を窒素ガスにて置換後、嫌氣的に 3 5 °C、120rpmで 7 2 時間静置培養し発酵食品を調製した。

【 0 0 7 7 】

得られた反応液について実施例 1 と同様に脂肪酸分析を行った結果、添加したリノール酸の一部が、共役リノール酸に変換されていることが判った。産生された共役リノール酸の全てが *cis*-9, *trans*-11 型共役リノール酸であった。

【 0 0 7 8 】

また、調製した発酵食品の官能評価を行ったところ、リノール酸無添加のものと同等のものが得られた。

【 0 0 7 9 】

【発明の効果】

本発明は以上説明した通り、本発明の共役脂肪酸の製造方法によれば、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化することができ、特に、リノール酸から生理効果の高い *cis*-9, *trans*-11 型共役リノール酸を選択的に高効率で製造できるという効果がある。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化する。

【解決手段】 二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を、共役化処理能を有するビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)属細菌又は該細菌より得た酵素を用いて、共役化する工程を含むもの。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-301286
受付番号	50201553090
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成15年 2月10日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000006884

【住所又は居所】 東京都港区東新橋1丁目1番19号

【氏名又は名称】 株式会社ヤクルト本社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100092082

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目21番19号 秀和第2

虎ノ門ビル 三和国际特許事務所

【氏名又は名称】 佐藤 正年

【代理人】

【識別番号】 100099586

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目21番19号 秀和第2

虎ノ門ビル 三和国际特許事務所

【氏名又は名称】 佐藤 年哉

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006884]

1. 変更年月日 1990年 8月 3日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都港区東新橋1丁目1番19号
氏 名 株式会社ヤクルト本社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.